

اندازه‌گیری ثابت تمایل (افینیتی) آنتی‌بادی مونوکلونال IgG ضد آنزیم الکالین فسفاتاز با استفاده از روش الیزا

محسن ناصری^۱- دکتر سید محمد مؤذنی^۲- دکتر علی‌اکبر پورفتح‌الله^۳- بهزاد مصباح‌زاده^۳

چکیده

زمینه و هدف: افینیتی آنتی‌بادی به آنتی‌ژن در بسیاری از موارد تأثیر بیولوژیکی مهمی در فعالیت آن آنتی‌بادی و همچنین در انجام سنجش‌های آزمایشگاهی ایمونولوژیکی مانند رادیو ایمونواسی (RIA) و ایمونوهیستوتیشیمی دارد. مطالعه حاضر با هدف سنجش افینیتی آنتی‌بادی مونوکلونال محصول کلون هیبریدومای A1G8F7 تولید شده نسبت به آنزیم الکالین فسفاتاز (ALP) انجام گردید.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی، روش‌های متعددی برای تعیین افینیتی و آویدیتی آنتی‌بادی تاکنون ابداع شده‌اند. در همه این روشها از سیستمی استفاده شده که در آن آنتی‌ژن و آنتی‌بادی با هم به تعادل برسند و آنگاه بدون تغییر دادن حالت تعادل، مقادیر آنتی‌ژن آزاد و آنتی‌ژن همراه شده با آنتی‌بادی سنجیده می‌شود. در این تحقیق از یک روش سریع الیزای رقبتی- که افینیتی آنتی‌بادی را در حالت محلول اندازه‌گیری می‌کند- برای سنجش میل پیوندی آنتی‌بادی مونوکلونال IgG ضد الکالین فسفاتاز تولید شده از کلون A1G8F7 استفاده شد.

یافته‌ها: غلظت ثابت آنتی‌بادی برای استفاده در الیزای اختصاصی مرحله دوم تعیین Dissociation Constant (K_d) به روش کلاتر، توسط یک الیزای رقبتی برابر $1\mu\text{g}/\text{ml}$ به دست آمد؛ با رسم نمودار کلاتر کلون A1G8F7 برابر 3×10^{-9} تخمین زده شد.

نتیجه‌گیری: با توجه به این که K_d آنتی‌بادی‌های طبیعی بدن برای بیشتر آنتی‌ژن‌ها بین 10^{-7} الی 10^{-11} متغیر است و با توجه به این که هر چه اندازه K_d کوچکتر باشد، افینیتی آنتی‌بادی بیشتر خواهد بود، آنتی‌بادی ترشحی از کلون A1G8F7 برای بیشتر سنجش‌های ایمونولوژیکی مناسب به نظر می‌رسد. عملاً در آزمایش‌های ایمونوهیستوتیشیمی و ایمونوهیستوتیشیمی که با این آنتی‌بادی مونوکلونال- همراه با آنزیم ALP در لایه سوم- انجام گردید، نتیجه رنگ‌آمیزی بسیار عالی و قابل مقایسه با نمونه مشابه تجاری (Dako شرکت APAAP) بود.

واژه‌های کلیدی: آنتی‌بادی مونوکلونال؛ افینیتی؛ آویدیتی؛ الیزا؛ الکالین فسفاتاز

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بیرجند (دوره ۱۱، شماره ۴، سال ۱۳۸۳)

^۱ نویسنده مسؤول؛ کارشناس ارشد ایمونولوژی؛ عضو هیأت علمی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند آدرس: بیرجند- خیابان غفاری- دانشگاه علوم پزشکی بیرجند- دانشکده پزشکی- بخش ایمونولوژی

تلفن: ۰۴۱-۴۴۴۳-۵۶۱-۵۶۱-۴۴۰۰۱. پست الکترونیک: naseri_m2003@yahoo.com

^۲ دانشیار گروه آموزشی ایمونولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس تهران

^۳ کارشناس ارشد فیزیولوژی؛ عضو هیأت علمی گروه آموزشی فیزیولوژی و فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند

مقدمه

تعیین میل پیوندی[†] آنتی‌بادی

افینیتی یک آنتی‌بادی به آنتی‌ژن مربوطه خود، در بسیاری موارد تأثیر بیولوژیکی مهمی در عمل آن آنتی‌بادی دارد؛ همچنین تولید زیاد آنتی‌بادی‌های با افینیتی پایین به عنوان یک نقص ایمنی در نظر گرفته می‌شود. افینیتی آنتی‌بادی بدون شک در ایمونوپاتولوژی بیماریهای خودایمن و بیماریهای کمپلکس ایمنی نیز دخالت دارد (۱-۴).

نقش افینیتی آنتی‌بادی در روش‌های ایمونوآسی مانند الیزا، RIA، ایمونوسیتوشیمی، ایمونوهیستوشیمی، افزایش اتصالات اختصاصی و کاهش اتصالات غیر اختصاصی و در نتیجه افزایش ضریب اطمینان جواب آزمایش خواهد بود.

تاکنون روش‌های متعددی برای تعیین افینیتی و آویدیتی آنتی‌بادی ابداع شده‌اند. در هریک از این روشها از سرمی استفاده می‌شود که در آن آنتی‌ژن و آنتی‌بادی با هم به تعادل رسیده‌اند ($Ab+Ag \rightleftharpoons Ab-Ag$)؛ آنگاه بدون تغییر دادن حالت تعادل، مقادیر آنتی‌ژن آزاد و آنتی‌ژن همراه شده با آنتی‌بادی، سنجیده می‌شود. برای انجام این کار، چند راه وجود دارد. برخی از محققان با استفاده از روش‌های فیزیکی مانند دیالیز، فیلتراسیون با ژل، سانتریفوژ و رسوب، آنتی‌بادی یا آنتی‌ژن آزاد را از آنتی‌ژن متصل به آنتی‌بادی جدا می‌کنند (۷-۵). برخی نیز از تغییرات به وجود آمده در ویژگیهای فلئورسنت آنتی‌ژن متصل به آنتی‌بادی استفاده می‌کنند (۸).

با استفاده از اطلاعات به دست آمده از این روشها، می‌توان ثابت تعادل (یعنی میل پیوندی یا K_a) را به دست آورد:

$$K = \frac{[Ab-Ag]}{[Ab][Ag]}$$

در این معادله، $[Ab-Ag]$ معادل غلظت آنتی‌ژن آزاد و $[Ab]$ معادل غلظت نواحی آزاد متصل‌شونده به آنتی‌ژن در حال تعادل است.

[§] Affinity

^{**} Radioimmunoassay (RIA)

^{††} Association Constant (K_a)

واکنش بین آنتی‌ژن و آنتی‌بادی یک واکنش تعادلی به صورت زیر است:



چنانچه $[Ab]$ غلظت جایگاه‌های آزاد آنتی‌بادی، $[Ag]$ غلظت جایگاه‌های آزاد آنتی‌ژن، $[x]$ غلظت کمپلکس Abt ، $[Ag-Ab]$ ، $[Agt]$ غلظت آنتی‌بادی کل و آنتی‌ژن کل فرض شوند، با تغییراتی در معادله فوق معادله کلاتر به دست می‌آید:

$$\text{Klotz Equation: } [Abt]/[Ag] = K_d/[Ag] + 1$$

حال چنانچه غلظت $[Abt]$ و $[Agt]$ را داشته باشیم، تعیین میزان K_d یا K_a مستلزم دانستن یکی از سه شاخص $[Ab]$ ، $[Ag]$ یا $[x]$ خواهد بود (۹).

مطالعه حاضر با هدف سنجش افینیتی آنتی‌بادی مونوکلونال محصول کلون هیبریدومای A1G8F7 تولید شده در دانشگاه تربیت مدرس تهران، نسبت به آنزیم آلکالین فسفاتاز (ALP) انجام گردید.

روش بررسی

اندازه‌گیری افینیتی آنتی‌بادی در حالت محلول با استفاده از روش الیزای رقابتی:

برای اندازه‌گیری K_d کلون A1G8F7 در این مطالعه تجربی، از یک روش الیزای رقابتی که افینیتی آنتی‌بادی را در حالت محلول اندازه‌گیری می‌کند، استفاده شد؛ این روش دارای دو مرحله اساسی می‌باشد:

الف- ابتدا بایستی آنتی‌بادی در یک غلظت ثابت (که تعیین مقدار این غلظت توضیح داده شده است)، با رقتها متوالی از آنتی‌ژن، در لوله مجاور شوند تا در یک فاز محلول به تعادل برسند.

ب- سپس میزان آنتی‌بادی آزاد باقیمانده در هر یک از رقتها - پس از رسیدن به حالت تعادل در لوله- با روش الیزای غیر مستقیم- که در آن آنتی‌ژن کف پلیت کوت شده است- ارزیابی گردد (۱۰، ۱۱).

دوتایی به همان ترتیب قبلی اضافه شد و برای نیم ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شد.

۴- برای هر پلیت پس از پایان انکوباسیون مراحل آزمایش الیزا ادامه یافت.

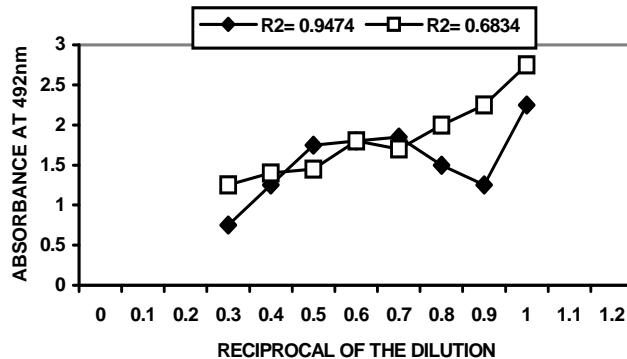
۵- نموداری بر حسب جذب نوری به دست آمده از دو پلیت در مقابل رقت‌های مختلف آنتی‌بادی رسم شد (نمودار ۱). بالاترین رقت از آنتی‌بادی (یعنی کمترین غلظت ممکن) که نمودار حاصل از پلیت‌های ۱ و ۲ بر هم منطبق باشند، انتخاب شد (رقت $1/4$ که برابر با غلظت $1/21\mu\text{g}$ می‌باشد).

تعیین **Dissociation Constant (K_d)**

۱- به پلیت الیزا آalkaline فسفاتاز (به عنوان Ag) با غلظت $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ افزووده شد و عمل کوتینگ در دمای ۴ درجه سانتیگراد برای یک شب انجام شد.

۲- در 10 لوله به میزان 250 میکرولیتر از 10 سریال رقت مختلف آنتی‌زن (تهیه شده در PBS-T از رقت 250 میکرولیتر از رقتی از آنتی‌بادی که در مرحله اول تعیین شد، $1/4$) افزووده شد. در یک لوله (لوله شماره 11) 500 میکرولیتر آنتی‌بادی بدون حضور آنتی‌زن اضافه شد.

۳- تمامی لوله‌ها برای یک شب در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرار گرفتند تا واکنش آنتی‌زن-آنتی‌بادی به تعادل برسد.



نمودار ۱- نمودار مربوط به تعیین غلظت ثابت آنتی‌بادی

مونوکلوناپیل $\text{A}_1\text{G}_8\text{F}_7$

تعیین غلظت ثابت آنتی‌بادی:

برای این که تخمین صحیح از غلظت آنتی‌بادی آزاد در حال تعادل به وجود آید، چند نکته باید در نظر گرفته شود:

۱- جذب 100 به دست آمده در مرحله آخر الیزای غیرمستقیم-که غلظت آنتی‌بادی آزاد را منعکس می‌کند- بایستی با غلظت آنتی‌بادی تست شده، مناسب باشد.

۲- فقط درصد کمی از مولکول‌های آنتی‌بادی آزاد (کمتر از 10% ، بایستی به آنتی‌زن‌های کوت‌شده در کف پلیت الیزا متصل شوند؛ زیرا از هر گونه اختلال در تعادل فاز مایع جلوگیری شود.

۳- چون K_d معمولاً به حرارت وابسته است، دما بایستی در تمام مراحل ثابت نگاه داشته شود.

برای رعایت نکات ۱ و ۲، نیاز به تعیین دامنه غلظت آنتی‌زن کوت‌شده و زمان مطلوب انکوباسیون محلول آنتی‌بادی در چاهک کوت‌شده است. برای به دست آوردن این دامنه از غلظت آنتی‌بادی از یک روش الیزای غیرمستقیم به شرح زیر استفاده گردید:

۱- دو پلیت الیزا به کار برد شد؛ در پلیت شماره ۱، به ۳ ردیف و در پلیت شماره ۲ به ۲ ردیف از چاهکها، $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ آalkaline فسفاتاز - به عنوان آنتی‌زن- اضافه شد و پلیت‌ها یک شب در دمای ۴ درجه سانتیگراد قرار گرفتند.

۲- به پلیت شماره ۱، پس از 3 بار شستشو، رقت‌های $1/2$ $1/4$ از آنتی‌بادی خارج شده با غلظت $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ به صورت تریپلیکیت (Triplicate) اضافه شد. از PBS-T 100 به عنوان شاهد منفی و از سرم موش با رقت $1/1000$ به عنوان شاهد مثبت استفاده شد. برای نیم ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد عمل انکوباسیون انجام شد.

۳- محتويات این پلیت - هر ردیف سه تایی در یک اپندرف جداگانه- با دقت جمع‌آوری شد (که کمتر از 300 میکرولیتر اپندرف خواهد شد) و به پلیت دوم به صورت

^{‡‡} Optical Density (OD)

^{§§} Phosphate Buffered Saline (PBS)

آنتىژن ALP اضافه شد و پس از انجام آزمون الiza جذب نوری آنها در ۴۹۲ نانومتر قرائت گردید.

طبق معادله کلاتر، اگر اعداد به دست آمده از دستگاه قرائتگر الiza را در اين معادله قرار دهيم، y معادله که همان

$$\frac{A_0}{A_0 - A_n} \text{ میباشد، به دست میآيد و مقدار } x \text{ معادله نیز}$$

$[1/Ag_{tn}]$ میباشد؛ مقدار غلظت آنزیم ALP - که به صورت سریال رقت در مرحله دوم تعیین K_d به کار گرفته شده بود - را بر حسب مول حساب نموده، به جای Ag_{tn} قرار می‌دهیم (نمودار ۲).

بحث و نتیجه‌گیری

اندازه‌گیری دقیق افینیتی آنتىبادي عملاً آسان نمی‌باشد.

برای آنتىژن‌های محلول که به آسانی خالص می‌شوند، می‌توان مقدار لازم آنتىژن خالص را به دست آورد و نشاندار نمود. در این صورت، روش RIA با آنالیز اسکاچارد، که امکان محاسبه ثابت افینیتی را می‌دهد، مناسب است.

جدول ۱- نتایج مربوط به تعیین K_d کلون $A_1G_8F_7$

جذب	۲۵۰ میکرولیتر آنزیم آلكالین فسفاتاز ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	۲۵۰ میکرولیتر آنتىبادي ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	شماره لوله
۰/۱۲۳	۲۵	۲/۴	۱
۰/۱۳۳	۱۵	۲/۴	۲
۰/۱۴۵	۱۲/۵	۲/۴	۳
۰/۱۳۵	۱۰	۲/۴	۴
۰/۱۵۶	۸	۲/۴	۵
۰/۱۵۷	۶/۲۵	۲/۴	۶
۰/۲۲۷	۴	۲/۴	۷
۰/۲۱۵	۳/۲۵	۲/۴	۸
۰/۳۲۷	۱/۵۶	۲/۴	۹
۱/۰۳۲	۰/۷۸	۲/۴	۱۰
۱/۲۳۱	۰/۳۹	۲/۴	۱۱
۱/۳۲۱	۰/۱۹	۲/۴	۱۲
۱/۳۵۱	۰/۰۹	۲/۴	۱۳
۱/۳۵۳	۰/۰۰	۲/۴	۱۴
۰/۰۸	شاهد منفي (PBS)		۱۵

۴- به منظور بررسی میزان آنتىبادي آزاد موجود در هر لوله به صورت دوتایی از محتوى لوله‌ها به پلیت الiza که در بند یک تهیه شده بود؛ اضافه شد و آزمون الiza انجام شد.

۵- با روش کلاتر افینیتی محاسبه شد.

$$\frac{A_0}{A_0 - A_1} = \frac{\text{معادله کلاتر}}{[Agt1] + 1}$$

A_0 : جذب نوری چاهکی است که حاوی محتويات اپندرف فاقد آنتىژن است.

A_1 : جذب نوری خوانده شده از چاهکی است که حاوی محتويات اپندرف شماره ۱ - که دارای بالاترين مقدار آنتىژن $(100 \mu\text{g})$ است - می‌باشد. مقدار x نیز برابر $[1/Ag_{tn}]$ خواهد بود؛ البته بايستی در این فرمول غلظت آنتىژن بر حسب مول باشد.

یافته‌ها

غلظت مناسب محلول آنتىبادي برابر $1/2 \mu\text{g}/\text{ml}$ به دست آمد؛ البته همان طور که قبلاً نیز بیان شد، غلظت محلول آنتىبادي در لوله‌ها بايستی دو برابر در نظر گرفته شود؛ زیرا پس از افزودن محلول آنتىژن هم حجم آن، غلظت آنتىبادي به نصف $(1/2 \mu\text{g})$ کاهش می‌یابد. چنانچه از سوب سلوی تخلیص نشده برای تعیین افینیتی استفاده شود، بايستی به کمک الیزای اختصاصی مرحله اول، رقت ثابتی از سوپرناکانت لازم برای مرحله دوم (تعیین K_d) به دست آید و غلظتهاهی متغیر آنتىژن در لوله با این رقت به دست آمده در مرحله اول مجاور شود.

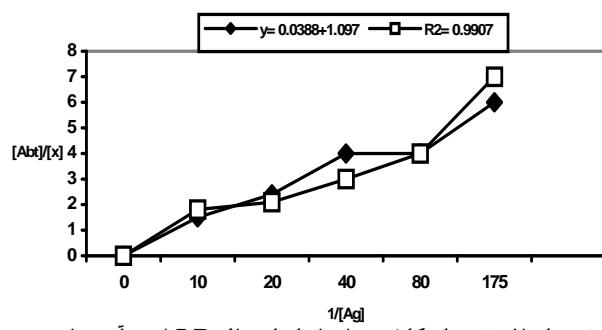
همان‌گونه که در جدول ۱ مشاهده می‌شود، در مرحله تعیین K_d ، سریال رقت آنزیم ALP از $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ تا $0.18 \mu\text{g}/\text{ml}$ (۰.۰۲۵ میکرولیتر از هر غلظت) انتخاب شد که به هر یک از آنها نسبت ۱:۱ از محلول آنتىبادي با غلظت ثابت $1/2 \mu\text{g}/\text{ml}$ اضافه شد.

در مرحله بعد - پس از انجام واکنش آنتىژن و آنتىبادي در لوله - محتوى لوله‌ها به پلیت الیزای کوت شده با $1 \mu\text{g}$

ثابت نمودن آنتیژن (در کف پلیت) اغلب باعث دنا توره شدن پروتئین می شود؛ بنابراین خواص اتصالی آن نیز تغییر می کند؛ علاوه بر این K_d در حالت محلول تعریف شده است؛ یعنی در فاز مایعی که آنتیژن و آنتی بادی هر دو به صورت محلول می باشند؛ در حالی که در آزمایشات فاز جامد یکی از آنها غیر متحرک است؛ بنابراین تخمین افینیتی (K_a) به کمک روش های فاز جامد، ممکن است دور از مقدار واقعی آن باشد.^(۱۶)

از طرفی اگر غلظت آنتی بادی توتال بیشتر از K_d باشد، نتایج تعیین افینیتی رضایت بخش نخواهد بود. حساسیت روش ایمو نو آنژیماتیک (EIA) با سوسترای کروموزنیک غلظت حداقل آنتی بادی توتال را به حدود M^{-10} محدود می کند^(۱۷)؛ بنابراین برای یک Ab با افینیتی خیلی بالا، باید آزمایش با کونژوگه های آلکالین فسفاتاز یا بتا- گالاکتوزیداز انجام شود؛ زیرا این آنزیم ها حساسیت آزمایش را افزایش می دهند و امکان کار کردن با غلظتهای پایین تر آنتی بادی را فراهم می سازند^(۱۸، ۱۹).

K_d آنتی بادی ها از 10^{-7} تا 10^{-11} متغیر است که هر چه عدد K_d کوچکتر باشد، افینیتی آن آنتی بادی بیشتر خواهد بود؛ البته در تمامی سنجش های ایمو نولوژیکی، بالا بودن افینیتی Ab مزیت نخواهد بود؛ به عنوان مثال چنانچه از مونوکلونال Ab آنتی بادی به دست آمده، بخواهیم در تخلیص آنتیژن در روش ستون کروماتو گرافی تمایلی استفاده نماییم، $K_d = 10^{-11}$ برای آنتی بادی دیگر مناسب نخواهد بود؛ زیرا در هنگام جداسازی آنتیژن از ستون Allocution نیاز به کاهش شدید pH بافر می باشد؛ لازم به ذکر است که بافر خیلی اسیدی، توانایی برهم زدن ساختار طبیعی آنتیژن و کاهش عمر ستون کروماتو گرافی تمایلی را دارد؛ برای مثال در تحقیق Sakharov و همکاران، کلون هیبریدوم ای App.1 مولد مونوکلونال آنتی بادی IgG₁ خد آنزیم ALP و دارای ثابت تجزیه $10^{-8} / 5 * 10^{-10}$ بود که پس از اتصال به سفارز در ستون کروماتو گرافی به دلیل بالا بودن نسبی افینیتی آنتی بادی برای



نمودار ۲- نمودار کلاتر حاصل از اتصال ALP به آنتی بادی مونوکلونال $A_1G_8F_7$

چون در مراحل نشاندار کردن پروتئین، کوچکترین تغییری در مولکول آنتیژن ممکن است اپی توپ اختصاصی آنتی بادی را از بین ببرد یا حداقل افینیتی اتصال آنتی بادی را تغییر دهد، نتایجی که از به کار بردن آنتیژن نشاندار به دست می آید باید با احتیاط تفسیر شود. هنگام به کار برده می شود- ثابت افینیتی به دست آمده، ممکن است تغییر نماید^(۱۲، ۱۳).

همچنین بایستی توجه داشت که اغلب آنتی سرم های پلی کلنان حاوی جمعیت گوناگونی از آنتی بادی علیه قسمتهای مختلف یک آنتیژن است و هر آنتی بادی دارای مقادیر K خاص خود است؛ تحت این شرایط دیگر نمودار اسکاچارد خطی نخواهد بود و به صورت یک منحنی در می آید که نشانگر ترکیب شدن خطها از هر آنتی بادی است.

تعیین یک شاخص کمی، شبیه ثابت تجزیه تعادلی یک کمپلکس Ab-Ag، به روش قابل اعتماد و مطمئنی نیاز دارد. دیالیز تعادلی، روش انتخابی برای هاپتن ها و آنتیژن های قابل دیالیز می باشد؛ در صورتی که برای آنتیژن های ماکرومولکولی قابل انجام نمی باشد.

از روش های بسیاری از قبیل الیزا، Surface Plasmon Resonance با آنتیژن یا مونوکلونال آنتی بادی ثابت شده روی پلیت ها یا روی Sensor Chip (مانند طلای پوشیده با هیدروژل دکستران کربوکسی متیله شده)، اغلب برای اندازه گیری افینیتی استفاده می شود^(۱۴، ۱۵).

چنین روش هایی بندرت K_d واقعی را نشان می دهند؛ زیرا

افینیتی بسیار مناسب به نظر می‌رسد (۲۲).

با توجه به این که K_d آنتی‌بادی مونوکلونال کلون $A_1G_8F_7^{-9}$ حدود 10^{-9} محاسبه گردید، انتظار می‌رود در اغلب

سنجهش‌های ایمونولوژیکی مناسب و کارایی داشته باشد و عملًا نیز در آزمونهای الیزا - به عنوان لایه دوم - و آزمونهای ALP ایمونوسیتوشیمی و ایمونوهیستوشنیمی - همراه با آنزیم به صورت کمپلکس APAAP برای لایه سوم - بسیار عالی و قابل مقایسه با کمپلکس APAAP خریداری شده از شرکت Dako می‌باشد.

آنژیم نتایج خیلی خوبی از ستون به دست نیامد؛ در صورتی که در رنگ‌آمیزی‌های ایمونوسیتوشنیمی و ایمونوهیستوشنیمی نتایج بسیار عالی نشان داد (۲۰).

در تحقیق Wu و همکاران نیز، آنتی‌بادی‌های مونوکلونال به دست آمده از کلون 4G10 پس از اتصال به سفارز در ستون کروماتوگرافی به منظور تخلیص اینترفرون آلفا به کار برده شدند که بازده آن بسیار عالی گزارش شد (با درجه خلوص بیش از ۹۵٪) (۲۱).

در مطالعه‌ای دیگر، مولد مونوکلونال آنتی‌بادی با افینیتی 5×10^{-5} بود که اساساً برای استفاده در ستون کروماتوگرافی

منابع:

- 1- Zola H. Monoclonal Antibodies. New York: Bios Scientific; 2000.
- 2- Steward MW, Lew AM. The importance of antibody affinity in the performance of immunoassays for antibody. *J Immunol Methods*. 1985; 78 (2): 173-90.
- 3- Marie-Pierre L, Lisa DO, Barry N, Michel EG. Measurement of the dissociation rate constant of antigen/antibody complexes in solution by enzyme-linked immunosorbent assay. *J Immunol Methods*. 1994; 170: 167-75.
- 4- Macdonald RA, Hosking CS, Jones CL. The measurement of relative antibody affinity by ELISA using thiocyanate elution. *J Immunol Methods*. 1988; 106: 191-94.
- 5- Dellerich M. Enzyme- immunoassay: a review. *J Clin Chem Clin Biochem* 1984; 22: 895-904.
- 6- Landon J. Enzyme immunoassay: techniques and uses. *Nature*. 1977; 268: 483-85.
- 7- Porstmann T, Kiessig ST. Enzyme immunoassay techniques: an overview. *J Immunol Methods*. 1992; 150: 5-21.
- 8- Phillips DJ, Wells TW, Reimer CB. Estimation of association constants of 42 monoclonal antibodies to human IgG epitopes using a fluorescent sequential-saturation assay. *Immunol Lett*. 1988; 17(2): 159-68.
- 9- Stenberg M, Nygren H. Kinetics of antigen-antibody reactions at solid-liquid interfaces. *J Immunol Methods*. 1988; 113 (1): 3-15.
- 10- Friguet B, Dyavacli L, Goldberg ME. Immunochemical Analysis of Protein Conformation. In: Creighton TE. Protein Structure: A Practical Approach. New York: Oxford University Press; 1997. pp. 323-49.
- 11- Rath S, Stanley CM, Steward MW. An inhibition enzyme immunoassay for estimating relative antibody affinity and affinity heterogeneity. *J Immunol Methods*. 1988; 106: 245-49.
- 12- Besman M, Coleman JE. Isozymes of bovine intestinal alkaline phosphatase. *J Biol Chem*. 1985; 260 (20): 11190-93.
- 13- Jacobsen C, Frich JR, Steensgaard J. Determination of affinity of monoclonal antibodies against human IgG. *J Immunol Methods*. 1982; 50 (1): 77-88.
- 14- Loomans EE, Roelen AJ, Van Damme HS, Bloemers HP, Gribnau TC, Schielen WJ. Assessment of the functional affinity constant of monoclonal antibodies using an improved enzyme-linked immunosorbent assay. *J Immunol Methods*. 1995; 184 (2): 207-17.
- 15- Larvor MP, Djavadi-Ohaniance L, Nall B, Goldberg ME. Measurement of the dissociation rate constant of antigen/antibody complexes in solution by enzyme-linked immunosorbent assay. *J Immunol Methods*. 1994; 170 (2): 167-75.

- 16- Underwood PA. Problem and pitfalls with measurement of antibody affinity using solid phase binding in the ELISA. *J Immunol Methods*. 1993; 164 (1): 119-30.
- 17- Ong GL, Mattes MJ. Re-evaluation of the concept of functional affinity as applied to bivalent antibody binding to cell surface antigens. *Mol Immunol*. 1993; 30 (16): 1455-62.
- 18- Alves CM, Marzocchi-Machado CM, Azzolini AE, Lucisano-Valim YM. The complement-fixing activity of immune complexes containing IgG antibodies of different functional affinities: effects on superoxide production by rabbit neutrophils. *Immunol Invest*. 2004; 33 (1): 39-50.
- 19- Li CK. ELISA-based determination of immunological binding constants. *Mol Immunol* 1985; 22 (3): 321-27.
- 20- Sakharov IYu, Mechetner EB, Stepanova IE, Shekhonin BV, Pletjushkina OYu. Monoclonal antibody to alkaline phosphatase from the intestinal mucosa of the harp seal, *Phoca groenlandica*. *Comp Biochem Physiol B*. 1992; 101 (4): 677-82.
- 21- Wu M, Ai Y, Ren R, Liang Y, Li J, Song W, et al. Preparation and application of monoclonal antibodies to recombinant human IFN alpha. *Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi*. 2002; 16 (3): 261-63. Chinese.
- 22- Yan J, Wang S, Mi JB, Guo ZQ, Chang WB. Production and characterization of anti-recombinant human erythropoietin (rhEPO) monoclonal antibody. *J Immunoassay Immunochem*. 2004; 25 (1): 91-101.

Measurement of affinity constant of Anti-human IgG Monoclonal antibodies with alkaline phosphatas enzyme by an ELISA-based method

M. Naseri*, SM. Moazzen** , AA. Pourfathollah** , B. Mesbahzadeh***

* Instructor, Department of Immunology, Faculty of Medicine, Birjand University of Medical Sciences, Birjand, Iran

** Associate Professor, Department of Immunology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modarres University, Tehran, Iran

*** Instructor, Department of Physiology and Pharmacology, Faculty of Medicine, Birjand University of Medical Sciences, Birjand, Iran

Abstract

Background and Aim: The affinity of an antibody with its antigen is a crucial parameter in its biological activity and carrying out immunologic tests such as radioimmunoassay (RIA) and immunohistochemistry. This study was done in our laboratory at Tarbiat Modarres University to measure the affinity constant of specific monoclonal antibodies/MAB ($A_1G_8F_7$) with alkaline phosphatase enzyme produced.

Material and Methods: Several Methods have been innovated to determine the affinity and avidity of antibodies. In all of them a serum is used in which antigen and antibody would reach balance and, without a change in the balance, free antigen and antigen associated with antibody are measured. Applying a rapid and simple ELISA-based method the affinity constant of specific MAB ($A_1G_8F_7$) against alkaline phosphatase was measured.

Results: Constant density of antibody for use in specific ELISA used to determine dissociation constant (K_d), applying klotz methodology-by means of a competitive ELISA proved to be $1\mu\text{g}$ K_d of $A_1G_8F_7$ clone; through klotz fig, it was estimated to be 3.8×10^{-9}

Conclusion: considering that the K_d of natural antibodies in the body for most antigens ranges from 10^{-7} to 10^{-11} and that the less K_d the more affinity of the antibody, the antibody secreted by $A_1G_8F_7$ clone seems suitable. Practically, in immunocytochemistry for most immunologic measuring, histochemistry test done with mAb-ALP enzyme in three line-staining led to pretty good and comparable results with the similar trade sample of APAAP (Dako, Denmark).

Key Words: Monoclonal antibody; Affinity avidity; ELISA; Alkaline phosphatase